

Synthesized Azomethines as Antioxidants: Theoretical and Experimental Studies / S. Shahab [at al.] // Current Molecular Medicine. – 2019. – Vol. 19, № 6. – P. 419–434.

9. Thompson, L. A. Synthesis and Applications of Small Molecule Libraries/ L. A. Thompson. J. A. Ellman // Chemical Reviews. – 1996. – V. 96. – №1. – P. 555–600.

10. General Atomic and Molecular Electronic-Structure System / M.W. Shmidt [at al.] // J. Comput. Chem. – 1993. – Vol. 14. – № 7. – P. 1347–1363.

11. Huzinaga, S. Gaussian Basis Sets for Molecular Calculations / S. Huzinaga, J. M. Andzelm, M. Klobukowski. – Amsterdam: Elsevier, 1984. – 264 p.

12. Азометины на основе ванилина и ваниляля / Е. А. Дикусар [и др.] – Нукус: «Каракалпакстан», 2007. – 207 с.

13. Азотсодержащие синтоны ванилинового ряда в органическом синтезе. Получение, применение, биологическая активность / Е. А. Дикусар [и др.] – В 2-х книгах. – Кн. 2. – Нукус: «Билим», 2010. – 226 с.

14. Замещенные бензальдегиды вани-

линового ряда в органическом синтезе: получение, применение, биологическая активность / Е. А. Дикусар [и др.] – Минск: Право и экономика, 2011. – 446 с.

15. Дикусар, Е.А. Бензальдегиды ванилинового ряда. Синтез производных, применение и биологическая активность / Е. А. Дикусар, В. И. Поткин, Н. Г. Козлов – Saarbrücken, Deutschland: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG, 2012. – 612 с.

16. Saleem, L. M. N. Trans-cis isomerization of Schiff's bases (N-benzylideneanilines) on addition of lanthanide shift reagents / L. M. N. Saleem // Organic Magnetic Resonance. – 1982. – Vol. 19, № 1. – P. 176–180.

*Адрес для корреспонденции:*

220072, Республика Беларусь,  
г. Минск, ул. Сурганова, 13,  
Институт физико-органической химии  
Национальной академии наук Беларуси,  
тел.: +375-17-2841600, моб. +375-29-6228644,  
e-mail: dikusar@ifoch.bas-net.by,  
Дикусар Е. А.

Поступила 23.03.2020 г.

УДК 615.322:615.07

А. А. Романюк, Д. В. Моисеев

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В КРУШИНЫ ЛОМКОЙ КОРЕ МЕТОДОМ ВЭЖХ

Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский  
университет, г. Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты оптимизации условий пробоподготовки, разработки и валидации методики количественного определения антраценпроизводных (франгулин А, эмодин, хризофанол и фисцион) крушины ломкой коры, идентифицированных с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Обоснована целесообразность проведения стандартизации данного вида лекарственного растительного сырья по эмодину.

Экстракцию антраценпроизводных проводили спиртом этиловым 80 % в течение 15 минут на кипящей водяной бане при соотношении сырья и экстрагента 1 : 25, кислотный гидролиз их гликозидов – 0,05 мл кислоты хлористоводородной Р в течение 30 минут. Хроматографический анализ выполняли на обращено-фазовой колонке Zorbax Stable Bond в изократическом режиме элюирования подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и 0,01 М раствора калия дигидрофосфата, доведенного кислотой фосфорной до pH 3,0 в соотношении 60 : 40 по объему.

В результате разработана специфичная методика количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры, которая валидирована по параметрам специфичности, линейности, правильности, точности, робастности, а также стабильности растворов стандартного образца и полученных экстрактов.

**Ключевые слова:** крушины ломкой кора, антраценпроизводные, высокоэффективная жидкостная хроматография, франгулин А, эмодин, хризофанол, фисцион.

## ВВЕДЕНИЕ

В лечении кишечных функциональных нарушений широко используют слабительные лекарственные средства растительного происхождения ввиду отсутствия у пациентов привыкания к ним и возможности их назначения для длительного применения [1].

Слабительные свойства проявляют растения, содержащие антраценпроизводные. Одним из них является крушина ломкая (*Frangula alnus* Mill.), лекарственное растительное сырье которой применяют в виде отвара, а также в составе желудочных и слабительных сборов [2, 3]. Помимо этого, комплекс биологически активных веществ крушины ломкой коры обладает противовирусным [4], антибактериальным [5], противогрибковым [6] и антиоксидантным эффектами [7].

Однако в области стандартизации данного вида лекарственного растительного сырья остаются нерешенные проблемы. В нормативной документации [8–10] для количественного анализа антраценпроизводных описана спектрофотометрическая методика, имеющая, на наш взгляд, недостатки: трудоемкость пробоподготовки (проведение экстракции, окисления восстановленных форм, кислотного гидролиза, переэкстракции с образованием окрашенных фенолятов), многостадийность (может приводить к потере анализируемых веществ), недостаточно высокая специфичность и точность.

Цель настоящего исследования – оптимизировать условия пробоподготовки, разработать и валидировать методику количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies, США) в комплекте

с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов G1313A (для сбора данных, обработки хроматограмм, а также спектров поглощения использовали программу Agilent ChemStation for LC 3D) и жидкостного хроматографа Agilent 1260 (Agilent Technologies, США) в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G5611A, диодно-матричным детектором G1315D, термостатом колонок G1316C, устройством для автоматического ввода образцов G5667A (для сбора данных, обработки хроматограмм, а также спектров поглощения использовали программу Agilent OpenLAB).

Объектом исследования являлись три серии крушины ломкой коры (производитель ООО «Биотест», Республика Беларусь, серия 730617 и серия 140218; АО «Красногорсклексредства», Российская Федерация, серия 90918).

Для анализа использовали колонки Zorbax Stable Bond (250 мм x 4,6 мм, 5 мкм, Agilent Technologies, США), проводя разделение в изократическом режиме. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (Biochem Chemopharma, Франция), а также 0,01 М раствора калия дигидрофосфата (х.ч.), который был доведен кислотой фосфорной (х.ч.) до pH 3,0 (в соотношении 60 : 40 по объему). Скорость подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин, температура колонки – 30 °С. Детектирование осуществляли при длинах волн 435 и 515 нм.

В исследовании использовали стандартные образцы антраценпроизводных: франгулин А (3-((6-диокси- $\alpha$ -L-маннопиранозил)окси)-1,8-дигидрокси-6-метил-9,10-антрацендион, CAS [521-62-0], «Carl Roth», Германия, batch #159283137), эмодин (1,3,8-тригидрокси-6-метил-9,10-антрацендион, CAS [518-82-1], «Cayman Chemical», США, batch #0472053), хризофанол (1,8-дигидрокси-3-метил-9,10-антрацендион, CAS [481-74-3], «Cayman Chemical», США, batch #0486299), фисцион

(1,8-дигидрокси-3-метоки-6-метил-9,10-антрацендион, CAS [521-61-9], «Сауман Chemical», США, batch #0541710).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При использовании спектрофотометрической методики, представленной в Государственной фармакопее Республики Беларусь, количественное определение антраценпроизводных крушины ломкой коры проводят при длине волны 515 нм после предварительной экстракции, извлечения из полученного экстракта агликонов антраценпроизводных петролейным эфиром, проведения окисления восстановленных форм раствором железа хлорида (III), а также кислотного гидролиза, экстракции агликонов диэтиловым эфиром и получения окрашенного раствора с магния ацетатом [8].

Нами была выполнена пробоподготовка по фармакопейной методике, за исключением добавления магния ацетата на последней стадии. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определено, что при длине волны 515 нм на хроматограмме извлечения пики веществ, относящиеся к антраценпроизводным, составляют лишь 18 % от суммы площадей пиков всех веществ, присутствующих на хроматограмме. Это видно из рисунка 1, где на хроматограмме идентифицирован по времени удерживания и сравнению спектра поглощения в ультрафиолетовой области со стандартным образцом эмодин. Остальные вещества – неидентифицированные фенольные соединения, которые не являются антраценпроизводными, однако вносят значительный вклад в их результат количественного определения по фармакопейной методике.

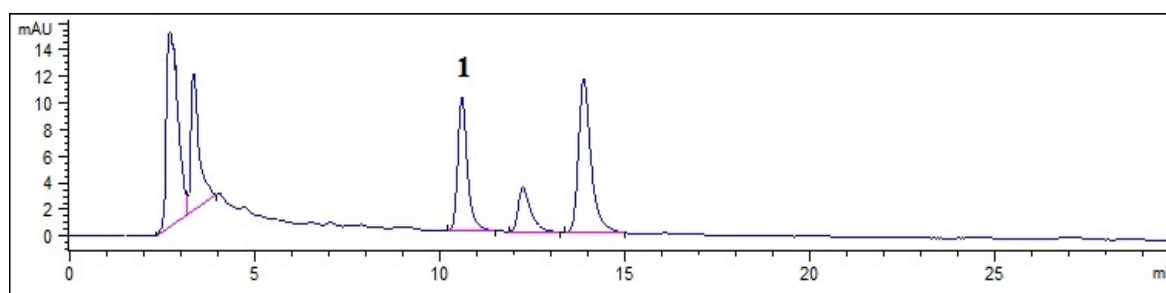


Рисунок 1. – Хроматограмма извлечения из крушины ломкой коры, полученного после пробоподготовки, проведенной по фармакопейной методике, за исключением добавления магния ацетата, при длине волны 515 нм (1 – эмодин)

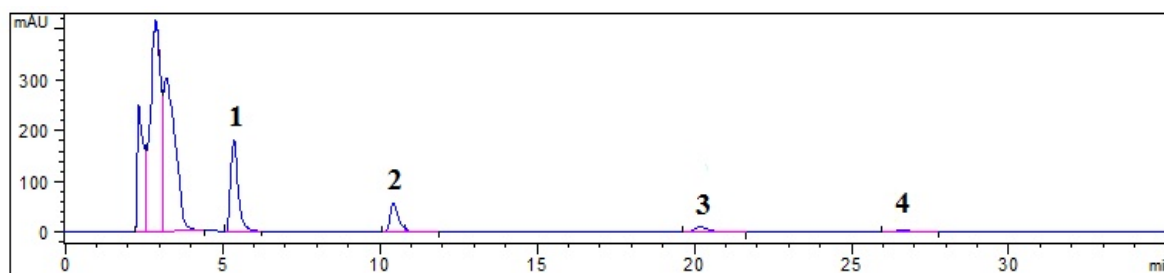
Таким образом, результаты количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры, полученные по спектрофотометрической методике Государственной фармакопеи Республики Беларусь, являются завышенными.

Помимо этого, при определении антраценпроизводных по фармакопейной методике до проведения гидролиза их агликоны удаляют петролейным эфиром и количественно не учитывают. На наш взгляд, методически это неправильно, так как в литературе имеются данные о потенциальном фармакологическом эффекте агликонов антраценпроизводных [11].

Куркиным В.А. и соавт. определено, что доминирующим антрахиноном крушины ломкой коры является франгулин А [12]. Ранее нами были определены оптимальные условия его экстракции (спирт

этиловый 80 % при соотношении сырья и экстрагента 1 : 25 в течение 15 минут на кипящей водяной бане) [13]. По временам удерживания и сравнению спектров поглощения в ультрафиолетовой области веществ из крушины ломкой коры со стандартными образцами, сопоставлением с литературными данными идентифицированы еще три антраценпроизводных: эмодин, хризофанол, фисцион (рисунок 2).

При разработке методики количественного определения было установлено, что в разных сериях исследуемого лекарственного растительного сырья содержание франгулина А различается значительно (до шести раз), ввиду чего целесообразно проводить стандартизацию сырья по эмодину, который образуется как главный продукт кислотного гидролиза гликозидов антраценпроизводных.



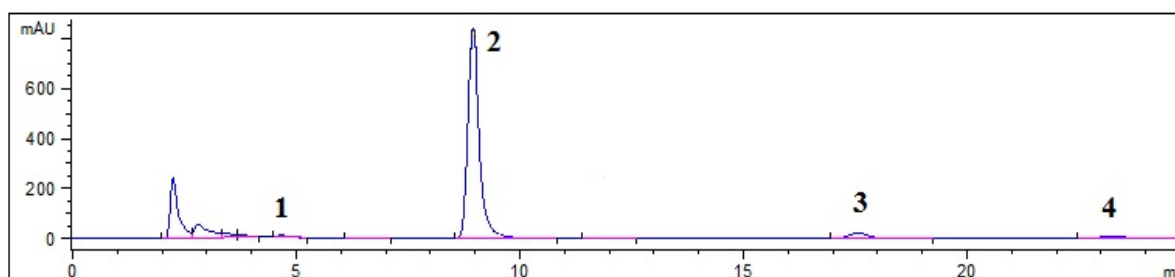
1 – франгулин А, 2 – эмодин, 3 – хризофанол, 4 – фисцион

Рисунок 2. – Хроматограмма извлечения из крушины ломкой коры при длине волны 435 нм

На рисунке 3 представлена хроматограмма извлечения после кислотного гидролиза.

Также нами установлены оптимальные условия проведения кислотного гидролиза. На рисунках 4 и 5 представлена

зависимость содержания суммы антраценпроизводных (франгулин А, эмодин, хризофанол и фисцион) от продолжительности проведения кислотного гидролиза и объема используемой для этого кислоты хлористоводородной Р.



1 – франгулин А, 2 – эмодин, 3 – хризофанол, 4 – фисцион

Рисунок 3. – Хроматограмма извлечения из крушины ломкой коры после кислотного гидролиза при длине волны 435 нм

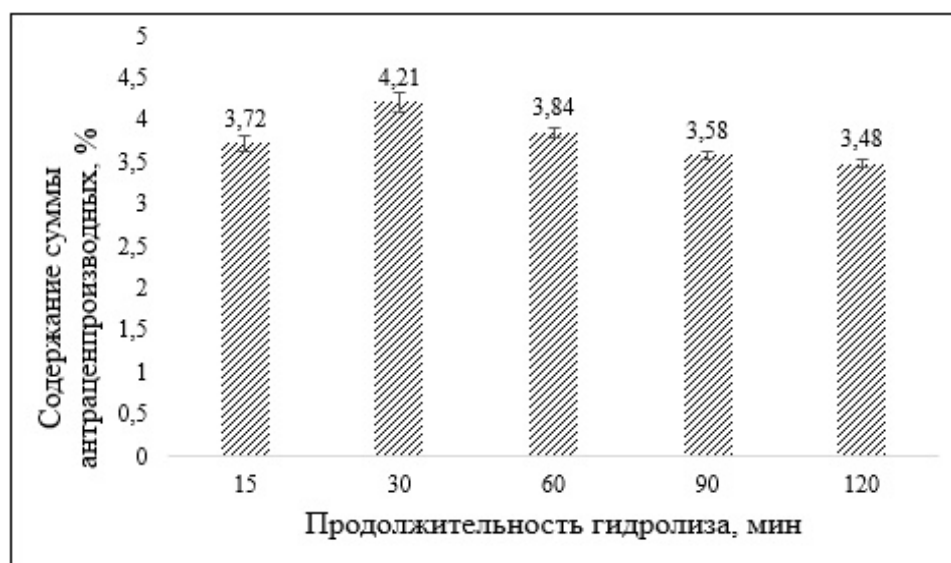


Рисунок 4. – Зависимость содержания суммы антраценпроизводных извлечения крушины ломкой коры от продолжительности проведения кислотного гидролиза (n = 3, P = 95 %)



Рисунок 5. – Зависимость содержания суммы антраценпроизводных извлечения крушины ломкой коры от объема добавленной кислоты хлороводородной P (n = 3, P = 95%)

Таким образом, определено, что максимальное содержание суммы антраценпроизводных в извлечении крушины ломкой коры отмечается при проведении кислотного гидролиза в течение 30 минут и использовании для этого 0,05 мл кислоты хлороводородной P. Поскольку дальнейшее увеличение данных параметров гидролиза приводит к заметному уменьшению количества анализируемых веществ, что, возможно, связано с их деструкцией в таких условиях, в качестве оптимальных выбраны условия гидролиза, при которых наблюдается наибольшее значение содержания суммы антраценпроизводных (0,05 мл кислоты хлороводородной P, 30 минут).

Валидацию разработанной методики количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры методом высокоэффективной жидкостной хроматографии проводили по параметрам специфичности, линейности, правильности, точности, робастности, стабильности растворов стандартного образца и полученных экстрактов [14, 15].

Специфичность методики подтверждали совпадением времен удерживания и спектров поглощения пиков франгулина А, эмолина, хризофанола и фисциона на хроматограммах растворов стандартных образцов франгулина А, эмолина, хризофанола и фисциона и испытуемых образцов лекарственного растительного сырья и отсутствием пиков на хроматограмме используемого растворителя (спирт этило-

вый 80 %). Также для этого использовали параметр спектральной чистоты пиков в лекарственном растительном сырье (не менее 99,1 %), селективность ( $\alpha > 1,1$ ), коэффициент разрешения пика эмолина от других пиков на хроматограмме ( $R_s > 5,06$ ). Помимо этого, оценивали эффективность разделения, которая по пику эмолина составила более 8 тысяч теоретических тарелок, хризофанола – более 9 тысяч теоретических тарелок, франгулина А – более 11 тысяч теоретических тарелок. Коэффициенты асимметрии были около 0,64, 0,72 и 0,95 соответственно.

Линейность методики устанавливали путем трехкратного построения градуировочного графика в диапазоне концентраций раствора эмолина 1,95–1000 мкг/мл, который представлен на рисунке 6.

Таким образом, разработанная методика обладает удовлетворительной линейностью, поскольку коэффициент корреляции в уравнении линейной регрессии составлял 0,9998 (должен быть не менее 0,999), пересечение градуировочной прямой с осью ординат – 0,3 % (при критерии приемлемости не более 2,0 %).

Правильность разработанной методики подтверждали методом стандартных добавок. Результаты представлены в таблице 1.

Методика является правильной, поскольку процент открываемости находился в пределах критерия приемлемости (95,0 – 105,0 %).

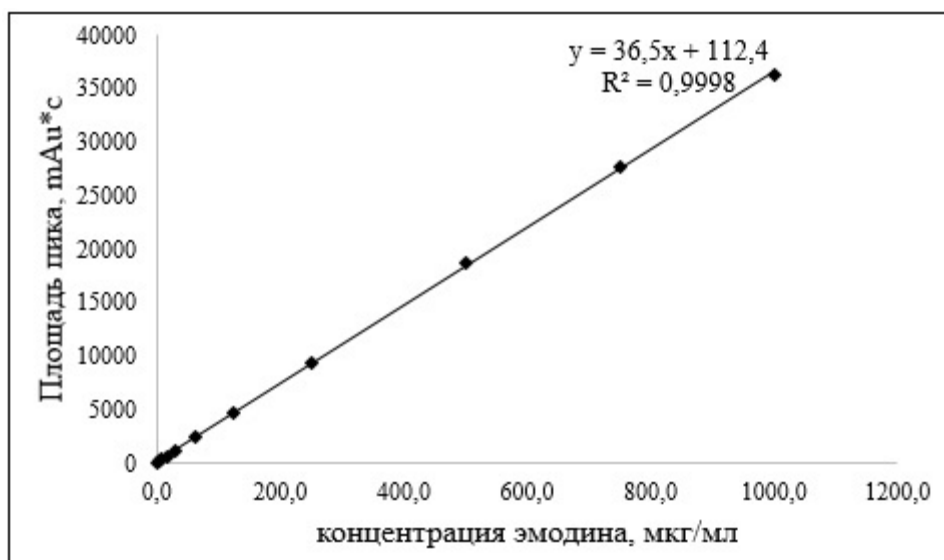


Рисунок 6. – Градуировочный график зависимости аналитического сигнала (площадь пика) от концентрации эмодина

Таблица 1. – Результаты определения правильности методики (n = 3, P = 95 %)

Исходная концентрация антраценпроизводных (мкг/мл)	Добавлено эмодина (мкг/мл)	Обнаружено суммы антраценпроизводных (мкг/мл)	Открываемость, %	Относительное стандартное отклонение (RSD, %)
533,9	300,0	793,1	95,1	0,18
533,9	200,0	745,8	101,6	1,45
533,9	100,0	665,0	104,9	0,16

Точность методики определяли по параметрам сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости. Сходимость проверяли, многократно повторяя методику определения на одном сырье одним и тем же аналитиком в один и тот же день (n = 6, P = 95 %). Относительное стандартное отклонение составило 1,1 %, что не превышает предельного значения критерия приемлемости (2,0 %). Внутрилабораторную воспроизжимость оценивали по результатам определений, проводимых двумя аналитиками в разные дни. Относительное стандартное отклонение составило 1,2 % (при критерии приемлемости не более 3,0 %).

Робастность проверяли путем изменения скорости потока подвижной фазы ( $1 \pm 0,1$  мл/мин), состава подвижной фазы (объемное содержание ацетонитрила  $60 \pm 5$ ), а также заменой колонки. Значения площадей пиков, полученные при хроматографировании растворов стандартного образца эмодина при заданных измененных условиях, отличались от исходных данных

не более чем на 1,0 % (при критерии приемлемости не более 2,0 %).

Стабильность растворов стандартного образца эмодина и испытуемого раствора определяли путем сравнения суммы площадей пиков антраценпроизводных и стандартного образца через равные промежутки времени при хранении в течение 24 часов при комнатной температуре. Уменьшение содержания анализируемых веществ составило не более 1,6 % (критерий приемлемости – не более 2,0 %). Следовательно, исследуемый раствор и раствор стандартного образца эмодина в течение 24 часов стабильны.

Таким образом, нами предлагается следующая методика количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры: 0,200 г измельченной коры (180) помещают в герметично закрывающийся стеклянный флакон, прибавляют 5,0 мл спирта этилового 80 %, укупоривают и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0,01 г. Далее помещают на кипящую водяную баню и экстрагируют в те-

чение 15 минут, периодически встряхивая, после чего охлаждают, центрифугируют. К 1,0 мл экстракта добавляют 0,05 мл *кислоты хлористоводородной Р* и нагревают в течение 30 минут на кипящей водяной бане. Затем охлаждают и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 80 %, перемешивают. Отбирают около 1 мл и центрифугируют в течение 5 минут. Переносят 0,50 мл надосадочной жидкости в виалу и 10 мкл инжeksiруют в хроматограф.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца: 25,0 мг стандартного образца эмодина растворяют в 25,0 мл спирта этилового 80 %.

Расчет количественного содержания антраценпроизводных (%) в пересчете на эмодин проводят по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times m_2 \times V_1 \times 10000}{S_2 \times m_1 \times V_2 \times (100 - W)}$$

где  $S_1$  – сумма площадей пиков антраценпроизводных на хроматограмме испытуемого образца;

$S_2$  – площадь пика эмодина на хроматограмме стандартного образца;

$m_1$  – масса навески сырья, г;

$m_2$  – масса эмодина в растворе стандартного образца, г;

$V_1$  – объем *спирта этилового 80 %*, взятый для экстракции антраценпроизводных из испытуемого образца, мл;

$V_2$  – объем спирта этилового 80 %, взятый для приготовления раствора стандартного образца, мл;

$W$  – потеря в массе при высушивании, %.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования установлено, что результаты количественного анализа крушины ломкой коры, полученные по спектрофотометрической методике, представленной в Государственной фармакопее Республики Беларусь, являются завышенными, поскольку антраценпроизводные при этом составляют лишь 18 % всех веществ, которые вносят вклад в результаты определения.

В лекарственном растительном сырье крушины ломкой идентифицированы антраценпроизводные франгулин А, эмодин, хризофанол и фисцион. Эмодин является

главным продуктом гидролиза гликозидов антраценпроизводных крушины ломкой коры, поэтому по нему целесообразно проводить стандартизацию. Обоснованы оптимальные условия проведения кислотного гидролиза: продолжительность – 30 минут, объем используемой *кислоты хлористоводородной Р* – 0,05 мл.

Разработана методика количественного определения антраценпроизводных крушины ломкой коры, которая заключается в экстракции антраценпроизводных спиртом этиловым 80 %, кислотном гидролизе их гликозидов и анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Доказано, что предложенная методика является специфичной, линейной, правильной, точной и робастной, в связи с чем может быть использована при контроле качества данного вида лекарственного растительного сырья.

### SUMMARY

A. A. Romanyuk, D. V. Moiseev  
DEVELOPMENT AND VALIDATION  
OF THE METHOD OF ANTHRACENE  
DERIVATIVES ASSAY IN ALDER  
BUCKTHORN BARK BY HPLC

The article presents the results of optimizing the conditions of sample preparation, development and validation of anthracene derivatives (frangulin A, emodin, chrysophanol and physcione) assay in alder buckthorn bark identified by HPLC method. The expediency of standardizing this type of medicinal plant raw material as to emodin is substantiated.

Anthracene derivatives were extracted with 80 % ethanol for 15 minutes in a boiling water bath with the ratio of raw material and extractant 1 : 25, the acid hydrolysis of their glycosides was 0.05 ml of hydrochloric acid R for 30 minutes. Chromatographic analysis was performed on a reversed phase column Zorbax Stable Bond in the isocratic mode of the mobile phase elution consisting of acetonitrile and 0,01 M potassium dihydrogen phosphate solution adjusted to pH 3,0 with phosphoric acid in a ratio of 60 : 40 to the volume.

As a result, a specific method of anthracene derivatives assay of alder buckthorn bark which was validated by specificity, linearity, precision, accuracy, robustness as well as the stability of standard sample solutions and extracts obtained was developed.

Keywords: alder buckthorn bark, anthracene derivatives, high performance liquid chromatography (HPLC), frangulin A, emodin, chrysophanol, physcione.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Рыкова, С. М. Применение растительных препаратов при лечении запора / С. М. Рыкова // Трудный пациент. – 2018. – № 6. – С. 26–33.

2. Куркин, В. А. Антраценпроизводные фармакопейных растений : монография / В. А. Куркин, А. А. Шмыгарева, А.Н. Саньков. – Самара : Офорт, 2016. – 210 с.

3. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения / под ред. Г. П. Яковлева. – 2-е изд., испр. и доп. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 863 с.

4. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants / R. Sydiskis [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 1991. – Vol. 35, № 12. – P. 2463–2466.

5. Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug / A. Bacha [et al.] // Biotech. – 2017. – Vol. 7, № 2. – P. 1–13.

6. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaca cerina* / N. Manojlovic [et al.] // Fitoterapia. – 2005. – Vol. 76, № 2. – P. 244–246.

7. Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs / D. Stef [et al.] // Romanian Biotechnological Letters. – 2009. – Vol. 14, № 5. – P. 4704–4707.

8. Государственная фармакопея Республики Беларусь: 2-ое издание, II том. Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья / под общ. ред. С. И. Марченко. – Молодечно: Победа, 2016. – 1368 с.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации: IV том / МЗ РФ. 14-е изд. – М.: Медицина, 2018. – 7019 с.

10. European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://online6.edqm.eu/ep900/>. – Дата доступа: 21.11.2019.

11. Rauwald, H. Herbal laxatives: influence of anthrones–anthraquinones on energy metabolism and ion transport in a model system / H. Rauwald // Phytomedicines of Europe. – 1998. – Vol. 9. – P. 97–116.

12. Куркин, В.А. Антрагликозиды коры крушины ломкой (*Frangula alnus* Mill.) / В. А. Куркин, А. А. Шмыгарева, Е. Д. Даева, В. И. Каденцев // Химия растительного сырья. – 2012. – № 1. – С. 83–86.

13. Романюк, А. А. Оптимизация условий экстракции франгулина А в крушины ломкой коре методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / А. А. Романюк, Д. В. Моисеев // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2019. – № 4. – С. 291–295.

14. Государственная фармакопея Республики Беларусь: 2-ое издание, I том. Общие методы контроля качества лекарственных средств / под общ. ред. А. А. Шерякова. – Молодечно: Победа, 2012 – 1220 с.

15. Технический кодекс установившейся практики 432-2012 (02041) Производство лекарственных средств. Валидация методик испытаний – Минск: Департамент фармацевтической промышленности, 2012. – 18 с.

#### Адрес для корреспонденции:

210009, Республика Беларусь,  
г. Витебск, пр. Фрунзе, 27,  
УО «Витебский государственный ордена  
Дружбы народов медицинский университет»,  
кафедра стандартизации лекарственных  
средств с курсом ФПК и ПК,  
тел. моб.: +375 29 218 65 28,  
Романюк А.А.

Поступила 14.04.2020 г.